*УДК577.34- 576.32/.36: 616-006.446*

# СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РАДИАЦИОННО-ИНДУЦИРОВАННОЙ ДИНАМИКИ ТРАНСКРИПТОМА РАКОВЫХ КЛЕТОК С НОРМАЛЬНЫМ И ДЕФЕКТНЫМ ГЕНОМ TP53

© 2012 Ю.В. Саенко, В.В. Учайкин, Р.Т. Сибатов, В.В. Саенко, В.А. Остаточников, Е.В. Кожемякина, О.В. Ляпейкова, О.С. Воронова, Д.А. Евсеев, Н.В. Белозеров, С.А. Васильев, О.С. Глущенко, И.В. Живодерников,

Ульяновский государственный университет

Поступила в редакцию 20.11.2012

В данной статье проведено сравнительное изучение динамики изменения экспрессии генов ключевых сигнальных путей связанных с программируемой клеточной смертью и репарацией ДНК в раковых клетках с нормальным и мутантным геном TP53.
Ключевые слова: апоптоз, ген TP53, репарация ДНК, экспрессия генов, транскриптом, рак, радиация.

Устойчивость злокачественных образований к курсам лучевой терапии связывают с нарушением механизмов запуска программируемой клеточной смерти, которые инициируются в результате повреждения ДНК клеток. Причина этого кроется в том, что раковые клетки несут мутации в ключевых генах, ответственных за эти процессы. Наиболее частой мутацией является мутация гена p53, кодирующего одноименный белок, который играет ряд ключевых ролей в механизмах инициации клеточной смерти, регуляции клеточного цикла и репарации ДНК [9]. Этот тип мутаций встречается в более чем 50% раковых клеток. Белок p53 является ключевым в процессах запуска апоптоза и опосредует передачу сигналов от ДНК-репарирующих механизмов [2, 3, 5]. Клетки дефицитные по белку p53 более устойчивы к воздействию ряда ДНК-повреждающих агентов, в том числе и к воздействию рентгеновского и гамма-излучений [2]. P53 является ключевым супрессором опухолей, который может подавлять развитие рака путём блокирования клеточного цикла или запуском программы апоптоза в ответ на множество различных вне- и внутриклеточных стрессовых сигналов [12]. Генетический анализ опухолевых клеток человека продемонстрировал ключевую роль p53 в подавлении онкологических процессов. Больше половины опухолей человека, из всего широкого спектра типов, несут мутации гена TP53, а наследование мутантного аллеля TP53 делает его носителей предрасположенными к онкологическому синдрому Ли-Фраумени [10]. Продукт гена TP53 – белок p53 ограничивает развитие опухоли, выступая в качестве своеобразного датчика клеточного стресса. Он реагирует на разнообразные стрессовые сигналы такие как: повреждение ДНК, гипоксия, экспрессию онкогенов, клеточное голодание и рибосомальная дисфункция. В случае возникновения подобных неблагоприятных условий p53 блокирует клеточную пролиферацию. В клетках подвергающихся мощному воздействию стрессовых факторов, p53 запускает необратимую программу апоптоза или старения, тем самым удаляя из организма потенциально злокачественные клетки [3]. Если стрессовые воздействия находятся в пределах способности клетки им противостоять, p53 участвует в запуске защитных программ, таких как временный арест клеточного цикла, репарации ДНК и синтеза белков антиоксидантной защиты. Это способствует поддержанию целостности генома и жизнеспособности в клетках, которые понесли поправимый ущерб от стрессовых факторов.

Таким образом, можно увидеть, что белок p53 играет ключевую роль практически во всех про-

*Саенко Юрий Владимирович кандидат биологических наук, старший научный сотрудник НИТИ.*
*E-mail: saenkoyv@yandex.ru*
*Учайкин Владимир Васильевич, доктор физико-математических наук, профессор, заведующий кафедрой теоретической физики.*
*Сибатов Ренат Тимергалиевич кандидат физико-математических наук, доцент кафедры теоретической физики.*
*Саенко Вячеслав Владимирович кандидат физико-математических наук, доцент кафедры теоретической физики.*
*Остаточников Владимир Александрович, аспирант, младший научный сотрудник НИТИ.*
*Кожемякина Елена Владиславовна, техник-лаборант кафедры теоретической физики.*
*Ляпейкова Ольга Васильевна, аспирант.*
*Воронова Ольга Сергеевна, кандидат биологических наук, младший научный сотрудник НИТИ.*
*Евсеев Дмитрий Александрович, студент.*
*Белозеров Никита Вячеславович, студент.*
*Васильев Степан Андреевич, студент.*
*Глущенко Евгения Сергеевна, аспирант, младший научный сотрудник НИТИ.*
*Живодерников Иван Владимирович, студент.*

цессах связанных с клеточным ответом на стресс и, в частности на радиационное воздействие. Изучение его роли в этих процессах поможет правильно выбрать тактику и стратегию терапии злокачественных новообразований с видоизменённым геном p53.

Целью настоящей работы явилось сравнительное изучение динамики изменения экспрессии генов ключевых сигнальных путей связанных с программируемой клеточной смертью и репарацией ДНК в раковых клетках с нормальным и мутантным геном TP53.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В экспериментах использовали клеточную линию рака прямой кишки человека HCT-116 (ATCC CLL - 247) с нормальным геном TP53 – HCT116 p53+/+ и изогенная клеточная линия HCT-116 с мутантным геном TP53 - HCT116 p53-/-. Клеточные линии были получены из American Type Culture Collection (ATCC). Клетки культивировали в модифицированной Дальбекко среде Игла с добавлением 5 % эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ L-глутамина, 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина при 37°С, во влажной атмосфере содержащей 5 % $CO_2$. Перед анализами клетки HCT-116 трипсинизировались. Из культурального сосуда с клетками удалялась среду культивирования и добавлялся 0,025 % раствор трипсина в физиологическом солевом растворе. Клетки инкубировались в термостате при 37°С, 1—2 мин. Трипсинизацию останавливали добавлением 0,5—1 мл среды DMEM. Клетки облучали рентгеновским излучением генерируемым терапевтическим акселератором Cliniac 600 при комнатной температуре в дозах 4 Грэй одноразово. Мощность дозы составляла 0,03 Гр/с, при фокусном расстоянии 104 см. Высота водяного столба над клетками составляла 1см. Клетки облучались в 24 луночных планшетах (объём лунки 2,5 мл.).

Профили экспрессии генов в клетках HCT116 p53+/+ и HCT116 p53-/-облученных в дозе 4 Гр изучали через 1, 12 и 24 часа после облучения с использованием микроматрицы Affymetrix (Санта-Клара, Калифорния, США) серии HGU133A (Human Genome U133A) содержащую ампликоны к 22216 генам.

РНК выделяли из $3x10^6$ клеток с использованием набора для выделения РНК (RNeasy Mini, Qiagen, США) в соответствии с инструкцией производителя. Целостность выделенной РНК проверяли с использованием биоанализатора Agilent 2100 по целостности 18S и 28S рибосомальной РНК с помощью электрофореза в 1 % агарозном геле. Библиотеку клонированных ДНК готовили с использованием набора GeneChip Expression 3'-Amplification One-Cycle cDNA Synthesis Kit (Affymetrix). Мечение биотином антисмысловых библиотек клонированных РНК и очистка были проведены с использованием набора GeneChip Expression 3'-Amplification Reagents for IVT Labeling (Affymetrix ) в соответствии с протоколом производителя. Количество полученной РНК и ДНК оценивалось спектрофотометрически с использованием спектрофотометра NanoDrop . Фрагментацию кРНК проводили при 94°С в термоциклере в течение 35 минут. Синтезированные биотинилированные кРНК вначале гибридизировали с контрольной матрицей “Test-3” с целью оценки качества полученныхкРНК. Если качество биотинилированных кРНК соответствовало расчётному то тогда проводили гибридизацию с матрицей HGU133A. Матрицу окрашивали стрептовидин-фикоэритрином. Окрашенную матрицу отмывали от не связавшегося белка и сканировали на сканере Gene Array G2500A (Agilent,Santa Clara, CA, USA) [7].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В таблицах 1 и 2 отражено радиационно-индуцированное изменение экспресии генов в клетках линий HCT-116 p53-/- и HCT-116 p53+/+ продукты которых участвуют в процессе регуляции программируемой клеточной смерти. В обеих клеточных линиях радиационное облучение индуцировало увеличение уровня мРНК прокаспаз 3,8 и 9. Сильнее всего рост экспрессии генов прокаспаз 3, 8 и 9 наблюдался через 1 час после облучения в дозе 4 Гр, а в случае линии HCT-116 p53-/- сохранялся и через 24 часа после облучения (табл.1), тогда как в клетках линии HCT-116 p53+/+ он был выше контрольных значений на 2-4%. Отсутствие различий в активности каспаз можно объяснить тем, что эти белки секретируются в форме про-ферментов, и для своей активации требуют отщепление определенных участков молекулы [6,8].

В клетках линии HCT-116 p53+/+ радиация стимулировала увеличение экспрессии генов TRADD и TRAF1, продукты которых белки - протеин ассоциированный с рецептором ФНО и фактор ассоциированный с рецептором ФНО участвуют в активации каспазы 8. Активация экспрессии генов TRADD и TRAF1 происходит не сразу после облучения, а начинается через 12 часов и достигает максимальных значений через 24 часа после облучения. Таким образом, увеличение уровня экспрессии гена прокаспазы 8 в облученных клетках линии HCT-116 p53+/+ сопровождается увеличением экспрессии генов коди-

**Таблица 1.** Динамика изменения экспрессии генов в клетках линии HCT-116 p53-/- продукты которых участвуют в процессе регуляции программируемой клеточной смерти. Данные представлены как отношение уровня экспрессии гена в облученных клетках к уровню экспрессии гена в контрольной группе (К – контроль; 4Гр 1ч, 4Гр 12ч, 4Гр 24 ч – в данных стобцах указаны уровни экспрессии генов через 1,12 и 24 часа после облучения в дозе 4Гр)

| **Название гена** | **Символ** | **К** | **4Гр 1 ч** | **4Гр 12ч** | **4Гр 24ч** |
|---|---|---|---|---|---|
| Прокаспаза 3 | Casp3 | 1 | 1,18 | 1,16 | 1,12 |
| Прокаспаза 9 | Casp9 | 1 | 1,27 | 1,09 | 1,10 |
| Прокаспаза 8 | Casp8 | 1 | 1,10 | 1,19 | 1,06 |
| Апоптоз-индуцирующий фактор | AIFM1 | 1 | 1,08 | 1,03 | 1,15 |
| Протеин ассоциированный с рецептором ФНО | TRADD | 1 | 0,97 | 0,97 | 0,98 |
| Фактор ассоциированный с рецептором ФНО | TRAF1 | 1 | 1,20 | 1,14 | 0,96 |
| Эндонуклеаза G | ENDOG | 1 | 1,10 | 1,24 | 1,07 |
| Проапоптотический белок Puma | Puma | 1 | 0,97 | 0,95 | 0,97 |
| Проапоптотический белок Smac/Diablo | DIABLO | 1 | 1,08 | 1,05 | 1,02 |
| Проапоптотический белок Apaf-1 | APAF1 | 1 | 1,15 | 1,11 | 1,23 |
| Проапоптотический белок Bim | BCL2L11 | 1 | 0,90 | 0,94 | 0,98 |
| Проапоптотический белок Bax | BAX | 1 | 0,90 | 0,86 | 1,01 |
| Проапоптотический белок Bak | BAK1 | 1 | 0,98 | 1,28 | 1,04 |
| Проапоптотический белок Bnip-3 | BNIP3 | 1 | 0,96 | 0,98 | 1,12 |
| Проапоптотический белок Bad | BAD | 1 | 1,06 | 1,20 | 1,27 |
| Катепсин A | CTSA | 1 | 0,89 | 0,89 | 0,90 |
| Катепсин B | CTSB | 1 | 0,78 | 0,67 | 0,79 |
| Катепсин D | CTSD | 1 | 0,68 | 0,72 | 0,82 |
| Катепсин H | CTSH | 1 | 1,08 | 0,80 | 0,90 |
| Катепсин K | CTSK | 1 | 1,28 | 0,76 | 0,86 |
| Антиапоптотический белок Bcl-2 | BCL2 | 1 | 1,17 | 1,02 | 0,97 |
| Антиапоптотический белок Bcl-XL | BCL2L1 | 1 | 0,70 | 0,66 | 0,91 |
| Антиапоптотический белок MCL-1 | MCL1 | 1 | 1,40 | 1,05 | 1,16 |
| Апоптоз-ингибирующий белок | XIAP | 1 | 1,24 | 1,07 | 1,25 |

рующих рецепторы к фактору некроза опухолей.

Митохондриальный путь реализации апоптоза связан с активацией каспазы 9 посредством апоптосом. в состав которых входит белок Apaf-1 и цитохром с. Высвободившийся из митохондрий цитохром с связывается с белком Apaf-1, который содержит два домена, один для связывания прокаспазы 9 и второй участок для связывания АТФ [1,5,8]. В гене ,кодирующем белок Apaf-1 найден p53-чувствительный элемент, который принимает участие в образовании апоптосомы. Экспрессия гена APAF1 в клетках линий HCT-116 p53-/- и HCT-116 p53+/+ увеличена на 23 и 16 % соответственно (таб. 1,2). Контроль высвобождения цитохрома с из митохондрий в цитоплазму в стрессовых условиях осуществляется семейством про- и анти-апоптотических белков BCL. Все белки Bcl-2 семейства разделены на три группы. К первой группе относятся белки запускающие программу апоптоза - Bax, Bak. Вторая группа объединяет антиапоптотические белки -Bcl-2, Bcl-$X_L$, Bcl-w, Mcl-1, A-1. Третья группа белков включает белки - Bim, Bid, Bad, Bik, BNIP3, Bad, Noxa, Puma [8,9]. Из таблиц 1 и 2 видно, что экпрессия генов проапоптотических белков Bax Bak, Bad и Bim практически не различается в облученных клетках линий HCT-116 p53-/- и HCT-116 p53+/+, тогда как экспрессия генов антиапоптотических белков Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1 в клетках линии HCT-116 p53-/- через 24 часа после облучения на 10-17 % выше чем в контрольной группе, а в клетках линии HCT-116 p53+/+ только на 1-2 %. Таким образом, можно сделать заключение, что в клетках линии HCT-116 p53-/- возможно блокирования запуска апоптоза по митохондриальному пути, что связано с сверх-экспрессией антиапоптотических белков семейства Bcl-2.

В таблицах 3 и 4 представлены данные анализа экспрессии генов в клетках линий HCT-116 p53-

**Таблица 2.** Динамика изменения экспрессии генов в клетках линии HCT-116 p53+/+ продукты которых участвуют в процессе регуляции программируемой клеточной смерти. Данные представлены как отношение уровня экспрессии гена в облученных клетках к уровню экспрессии гена в контрольной группе (К – контроль; 4Гр 1ч, 4Гр 12ч, 4Гр 24 ч – в данных стобцах указаны уровни экспрессии генов через 1,12 и 24 часа после облучения в дозе 4Гр)

| Название гена | Символ | К | 4Гр 1 ч | 4Гр 12ч | 4Гр 24ч |
|---|---|---|---|---|---|
| Прокаспаза 3 | Casp3 | 1 | 1,05 | 1,08 | 1,02 |
| Прокаспаза 9 | Casp9 | 1 | 1,12 | 0,93 | 1,03 |
| Прокаспаза 8 | Casp8 | 1 | 1,08 | 1,24 | 1,09 |
| Апоптоз-индуцирующий фактор | AIFM1 | 1 | 0,96 | 1,01 | 1,07 |
| Протеин ассоциированный с рецептором ФНО | TRADD | 1 | 1,03 | 1,06 | 1,10 |
| Фактор ассоциированный с рецептором ФНО | TRAF1 | 1 | 0,97 | 1,06 | 1,04 |
| Эндонуклеаза G | ENDOG | 1 | 0,90 | 1,11 | 1,04 |
| Проапоптотический белок Puma | Puma | 1 | 0,91 | 0,82 | 0,93 |
| Проапоптотический белок Smac/Diablo | DIABLO | 1 | 0,98 | 0,96 | 0,96 |
| Проапоптотический белок Apaf-1 | APAF1 | 1 | 1,19 | 1,11 | 1,16 |
| Проапоптотический белок Bim | BCL2L11 | 1 | 1,05 | 1,08 | 0,93 |
| Проапоптотический белок Bax | BAX | 1 | 0,79 | 0,99 | 0,86 |
| Проапоптотический белок Bak | BAK1 | 1 | 1,04 | 1,21 | 1,04 |
| Проапоптотический белок Bnip-3 | BNIP3 | 1 | 0,94 | 1,01 | 1,07 |
| Проапоптотический белок Bad | BAD | 1 | 0,95 | 1,06 | 1,09 |
| Катепсин A | CTSA | 1 | 1,05 | 0,98 | 1,03 |
| Катепсин B | CTSB | 1 | 0,93 | 0,91 | 1,01 |
| Катепсин D | CTSD | 1 | 0,85 | 0,96 | 0,96 |
| Катепсин H | CTSH | 1 | 0,93 | 0,82 | 1,06 |
| Катепсин K | CTSK | 1 | 1,33 | 0,94 | 1,14 |
| Антиапоптотический белок Bcl-2 | BCL2 | 1 | 1,08 | 0,98 | 1,06 |
| Антиапоптотический белок Bcl-XL | BCL2L1 | 1 | 1,00 | 1,04 | 1,03 |
| Антиапоптотический белок MCL-1 | MCL1 | 1 | 1,52 | 1,05 | 1,01 |
| Апоптоз-ингибирующий белок | XIAP | 1 | 0,95 | 0,92 | 1,07 |

/- и HCT-116 p53+/+ продукты которых участвуют в различных механизмах репарации ДНК. Эукариотические клетки имеют несколько репарирующих систем ответственных за поддержание первичной структуры ДНК и элиминацию мутаций: 1) система эксцизионной репарации удалением поврежденных оснований (BER); 2) система репарации ошибочно спаренных нуклеотидов (MMR); 3)система эксцизионная репарация нуклеотидов (NER); 4) система репарации путем соединения негомологичных концов. Кроме этих систем существует также ряд самостоятельных ферментов которые непосредственно или косвенно участвуют в процессах репарации [11].

Пострепликационная репарация ошибочно спаренных нуклеотидов(MMR) представляет собой важнейший механизм для поддержания стабильности микросателлитов через коррекцию неправильно спаренных оснований и репарации делеций и вставок. Эти события обнаруживаются и обрабатываются гетеродимерными белками семейства MutS и MutL. Комплекс MSH2 - MSH6 может узнавать неправильно спаренные основания, а также вставки или делеции в материнской или дочерней цепей [11]. Экспрессия генов пострепликационной репарации ошибочно спаренных нуклеотидов(MMR), которая связана с генетической стабильностью генома, в клетках линий HCT-116 p53-/- и HCT-116 p53+/+ отличается по величине индукции экспрессии этих генов. В клетках линии HCT-116 p53-/- индукция экспрессии генов MLH1, MSH2 и MSH6 является более выраженной, чем в клетках линии HCT-116 p53+/+, но радиационно-индуцированное увеличение экспрессии этих генов наблюдается в обеих линиях. Из приведенных данных видно, что в клетках HCT-116 p53-/-, с неактивным белком p53, активность системы пострепликационной репарация ошибочно спаренных нуклеотидов после радиационного воздействия на

**Таблица 3.** Изменение экспрессии генов в клетках линии HCT-116 p53-/- продукты которых участвуют в различных механизмах репарации ДНК. Данные представлены как отношение уровня экспрессии гена в облученных клетках к уровню экспрессии гена в контроле (MMR – Репарация ошибочно спаренных нуклеотидов; BER – эксцизионная репарация удалением поврежденных оснований; NER – Эксцизионная репарация нуклеотидов; HRR – репарация путем гомологичной рекомбинации; NHEJ – Репарация путем соединения негомологичных концов; К – контроль; 4Гр 1ч, 4Гр 12ч, 4Гр 24 ч – в данных стобцах указаны уровни экспрессии генов через 1,12 и 24 часа после облучения в дозе 4Гр)

| Название белка | Ген | Механизм репарации | К | 4Гр 1ч | 4Гр 12ч | 4Гр 24ч |
|---|---|---|---|---|---|---|
| О-6-метил:гуанин ДНК метилтрансфераза | MGMT | | 1,00 | 1,00 | 1,01 | 0,99 |
| 8-оксигуанин-ДНК гликозилаза | OGG1 | | 1,00 | 1,12 | 1,63 | 1,41 |
| Рибонуклеотид-дифосфат редуктаза большая суб. | RRM1 | | 1,00 | 1,00 | 1,06 | 1,09 |
| Рибонуклеотид-дифосфат редуктазамалая суб. | RRM2 | | 1,00 | 1,55 | 1,17 | 1,08 |
| Белок гомологичный MutL (E.coli) | MLH1 | MMR | 1,00 | 1,12 | 1,21 | 1,16 |
| Белок гомологичный MutS (E.coli) | MSH2 | MMR | 1,00 | 1,13 | 1,26 | 1,25 |
| Белок гомолог MutS6 (E.coli) | MSH6 | MMR | 1,00 | 1,01 | 1,17 | 1,26 |
| Апурин:апиримидиновая эндонуклеаза | APEX1 | BER | 1,00 | 1,02 | 1,04 | 1,03 |
| N-метилпуриновая-ДНК гликозилаза | MPG | BER | 1,00 | 0,88 | 0,83 | 0,96 |
| поли(АДФ) полимераза | PARP1 | BER | 1,00 | 0,99 | 1,00 | 1,05 |
| ДНК-репарирующий белок XRCC1 | XRCC1 | BER | 1,00 | 0,79 | 0,96 | 1,01 |
| ДНК-репарирующий белок XPA | XPA | NER | 1,00 | 1,29 | 1,22 | 1,17 |
| Экзиционный ДНК-репарирующий белок ERCC1 | ERCC1 | NER | 1,00 | 1,24 | 1,32 | 1,26 |
| ДНК-репарирующий белок XPD | ERCC2 | NER | 1,00 | 0,97 | 1,00 | 0,87 |
| ДНК-репарирующий белок XPC | XPC | NER | 1,00 | 1,02 | 0,97 | 0,99 |
| ДНК-репарирующий белок гомолог RAD51 | Rad51 | HRR | 1,00 | 1,14 | 1,41 | 1,28 |
| ДНК-репарирующий белок XRCC3 | XRCC3 | HRR | 1,00 | 0,86 | 1,32 | 1,10 |
| Белок восприимчивости к раку молочной железы 1 тип | BRCA1 | HRR | 1,00 | 0,97 | 1,43 | 1,35 |
| Белок восприимчивости к раку молочной железы 2 тип | BRCA2 | HRR | 1,00 | 0,91 | 1,68 | 1,60 |
| Тироидный аутоантиген 70 кДа (Ku антиген) | XRCC6 | NHEJ | 1,00 | 1,02 | 1,00 | 1,04 |
| Ku86 аутоантиген | Ku86 | NHEJ | 1,00 | 1,02 | 1,07 | 1,05 |

связана с белком p53. Аналогичное заключение можно сделать и для системы эксцизионной репарации путем удалением поврежденных оснований. Радиационно-индуцированное изменение экспрессии генов продукты которых принимают участие в BER одинаково для клеточных линий HCT-116 p53-/- и HCT-116 p53+/+ (табл 3,4; гены -UNG, APEX1, MPG, PARP и XRCC1).

Система эксцизионной репарации нуклеотидов в клетках мутантных по гену TP53 функционирует более активно, чем в клетках с нормальным геном TP53. Высокие уровни экспрессии генов XPA, XPD, ERCC1 и ERCC2, после радиационного воздействия, характерны для линии HCT-116 p53-/- (таб. 3), но не для линии HCT-116 p53+/+ (таб. 3) . Однако увеличение экспрессии этих генов нельзя напрямую связывать с влиянием белка p53. Вероятнее всего, статус гена TP53 оказывает опосредованное влияние на экспрессию генов системы NER через модуляцию митохондриального биогенеза и внутриклеточную концентрацию оксида азота [4]. Таким образом, можно сделать заключение, что в клетках с мутантным геном TP53, после радиацинного воздействия происходит активация системы эксцизионной репарации нуклеотидов, тогда как в клетках с диким типом гена TP53 радиация не активирует систему эксцизионной репарации нуклеотидов.

Системы репарации двунитевых разрывов цепей ДНК - репарация путем соединения него-

**Таблица 4.** Изменение экспрессии генов в клетках линии HCT-116 p53+/+ продукты которых участвуют в различных механизмах репарации ДНК. Данные представлены как отношение уровня экспрессии гена в облученных клетках к уровню экспрессии гена в контроле.(MMR - Репарация ошибочно спаренных нуклеотидов; BER - эксцизионная репарация удалением поврежденных оснований;NER - Эксцизионная репарация нуклеотидов; HRR - репарация путем гомологичной рекомбинации; NHEJ - Репарация путем соединения негомологичных концов; К – контроль; 4Гр 1ч, 4Гр 12ч, 4Гр 24 ч – в данных стобцах указаны уровни экспрессии генов через 1,12 и 24 часа после облучения в дозе 4Гр)

| Название белка | Ген | Механизм репарации | К | 4Гр 1ч | 4Гр 12ч | 4Гр 24ч |
|---|---|---|---|---|---|---|
| О-6-метил:гуанин ДНК метилтрансфераза | MGMT | | 1,00 | 0,93 | 0,94 | 0,99 |
| 8-оксигуанин-ДНК гликозилаза | OGG1 | | 1,00 | 0,92 | 1,07 | 1,00 |
| Рибонуклеотид-дифосфат редуктаза большая суб. | RRM1 | | 1,00 | 0,95 | 1,00 | 0,99 |
| Рибонуклеотид-дифосфат редуктазамалая суб. | RRM2 | | 1,00 | 1,22 | 1,09 | 0,97 |
| Белок гомологичный MutL (E.coli) | MLH1 | MMR | 1,00 | 1,26 | 1,24 | 1,16 |
| Белок гомологичный MutS (E.coli) | MSH2 | MMR | 1,00 | 0,99 | 1,11 | 1,06 |
| Белок гомолог MutS6 (E.coli) | MSH6 | MMR | 1,00 | 0,90 | 1,06 | 1,02 |
| Апурин:апиримидиновая эндонуклеаза | APEX1 | BER | 1,00 | 0,99 | 1,00 | 0,99 |
| N-метилпуриновая-ДНК гликозилаза | MPG | BER | 1,00 | 0,94 | 0,91 | 0,99 |
| поли(АДФ) полимераза | PARP1 | BER | 1,00 | 1,01 | 0,99 | 1,04 |
| ДНК-репарирующий белок XRCC1 | XRCC1 | BER | 1,00 | 0,96 | 0,92 | 1,00 |
| ДНК-репарирующий белок XPA | XPA | NER | 1,00 | 1,03 | 1,08 | 1,00 |
| Экзиционный ДНК-репарирующий белок ERCC1 | ERCC1 | NER | 1,00 | 0,95 | 0,94 | 1,00 |
| ДНК-репарирующий белок XPD | ERCC2 | NER | 1,00 | 1,00 | 0,99 | 0,87 |
| ДНК-репарирующий белок XPC | XPC | NER | 1,00 | 1,01 | 0,97 | 0,99 |
| ДНК-репарирующий белок гомолог RAD51 | Rad51 | HRR | 1,00 | 1,00 | 1,15 | 1,14 |
| ДНК-репарирующий белок XRCC3 | XRCC3 | HRR | 1,00 | 1,00 | 1,10 | 1,15 |
| Белок восприимчивости к раку молочной железы 1 тип | BRCA1 | HRR | 1,00 | 1,00 | 1,23 | 1,14 |
| Белок восприимчивости к раку молочной железы 2 тип | BRCA2 | HRR | 1,00 | 1,28 | 1,44 | 1,54 |
| Тироидный аутоантиген 70 кДа (Ku антиген) | XRCC6 | NHEJ | 1,00 | 0,99 | 0,99 | 1,02 |
| Ku86 аутоантиген | Ku86 | NHEJ | 1,00 | 0,98 | 1,06 | 1,01 |

мологичных концов (NHEJ) и репарация путем гомологичной рекомбинации (HRR) под воздействием радиационного облучения активируются одинаково в клетках линий HCT-116 p53-/- и HCT-116 p53+/+ (таб. 3,4; гены -RAD51, BRCA1, XRCC3, XRCC6 и Ku86).

Таким образом, сравнительный анализ экспрессии генов , продукты которых участвуют в механизмах реализации программируемой клеточной смерти и репарации ДНК в клетках линий HCT-116 p53-/- и HCT-116 p53+/+ через 1, 12 и 24 часа после радиационного воздействия в дозе 4 Гр позволил сделать следующие выводы:

1) Мутация гена TP53 подавляет запуск программируемой клеточной смерти индуцируемой через каспазный и каспаз-независимый механизмы;

2) В клетках содержащих нормальный ген TP53 радиационное воздействие индуцирует апоптоз по внешнему и внутреннему (митохондриальному) механизму активации;

3) Блокирования индукции апоптоза по митохондриальному пути в TP53 мутантных клетках связано с сверхэкспрессией антиапоптотических белков семейства Bcl-2.

4) Радиационно-индуцированное изменение экспрессии генов продукты которых принимают участие в эксцизионной репарации удалением

поврежденных оснований (BER), репарации путем гомологичной рекомбинации (HRR) и репарации путем соединения негомологичных концов (NHEJ) происходят одинаково в клеточных линий HCT-116 p53-/- и HCT-116 p53+/+ и не зависит от статуса гена TP53.

5)В клетках с мутантным геном TP53 после радиацинного воздействия происходит активация системы эксцизионной репарации нуклеотидов (NER) , тогда как в клетках с диким типом гена TP53 радиация не активирует систему эксцизионной репарации нуклеотидов.

## БЛАГОДАРНОСТИ

*Работа выполнена при поддержке федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» грант №14.B37.21.0558.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A novel, high conductance channel of mitochondria linked to apoptosis in mammalian cells and Bax expression in yeast / *Pavlov E.V. , Priault M., Pietkiewicz D., Cheng H.-Y., Antonsson B., Manon S., Korsmeyer S., Mannella C. A., Kinnally K.W.* // Journal of Cell Biology. 2001. Vol.155. №5. P. 725-732.
2. *Brooks C., Gu W.* P53 ubiquitination: Mdm2 and beyond // Mol. Cell. 2006. Vol. 21. № 3. P. 307-315.
3. *Caelles C., Helmberg A., Karin M.* P53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes // Nature. 1994. Vol. 370. №. 6486. P. 220-233.
4. *Carreras M.C., Poderoso J.J.* Mitochondrial nitric oxide in the signaling of cell integrated responses // American journal of physiology. Cell Physiology. 2007. Vol.292., №.5. P. 1569-1580.
5. *Chipuk J. E., Bouchier-Hayes L., Kuwana T.* PUMA couples the nuclear and cytoplasmic proapoptotic function of p53 // Science. 2005. Vol. 309. № 5741. P. 1732-1735.
6. *Colin A., Seamus M.J.* Apoptosis: Calling Time on Apoptosome Activity // Sci. Signal. 2009. Vol.2. № 91. P.62-64.
7. *Coller H.A., Grandori C., Tamayo P.* Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that myc regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion./ H.A. Coller, C. Grandori, P.Tamayo // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2000. Vol. 97. № 7. P. 3260-3265.
8. *Huang D.C., Strasser A.* BH3-only proteins - essential initiators of apoptotic cell death // Cell. 2000. Vol.103. P.839-842.
9. *Levine A.J., Oren M.* The first 30 years of p53: growing ever more complex // Nat. Rev.Cancer. 2009. Vol. 9. P. 749-758.
10. *Olivier M., Hollstein M., Hainaut P.* TP53 Mutations in Human Cancers: Origins, Consequences, and Clinical Use // Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. 2010. Vol. 2, № 1. P. 25-117.
11. *Shah S. N., Hile S.E., Eckert K.A.* Defective mismatch repair, microsatellite mutation bias, and variability in clinical cancer phenotypes // Cancer Research. 2010. Vol.70. №2. P.431-435.
12. *Vousden K. H., Prives C.* Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53 / K.H. Vousden, C. Prives // Cell. 2009. Vol. 137. P/ 413-431.

## COMPARATIVE STUDY OF RADIATION-INDUCED TRANSCRIPTOME DYNAMICS IN CANCER CELLS WITH NORMAL AND DEFECTIVE TP53 GENE

© 2012 Y.V. Saenko, V.V. Uchaikin, R.T. Sibatov, V.V. Saenko, V.A. Ostatochnikov, E.V. Kozhemiakina, O.V. Liapeikova, O.S. Voronova, D.A. Evseev, N.V. Belozerov, S.A.Vasiliev, E.S. Gluschenko, I.V. Zhivodernikov

Ulyanovsk State University

In this article we made a comparative study of the dynamics changes in gene expression of key signaling pathways associated with programmed cell death and DNA repair in cancer cells with normal and mutant TP53.

Keywords: apoptosis, TP53 gene, DNA repair, gene expression, transcriptome, cancer, radiation.

*Yury Saenko, Candidate of Biology, Senior Research Fellow. E-mail: saenkoyv@yandex.ru*
*Vladimir Uchaikin, Doctor of Physics and Mathematics, Professor, Head at the Theoretical Physics Department.*
*Renat Sibatov, Candidate of Physics and Mathematics, Associate Professor at the Theoretical Physics Department.*
*Viacheslav Saenko, Candidate of Physics and Mathematics, Associate Professor at the Theoretical Physics Department.*
*Vladimir Ostatochnikov, Graduate Student, Associate Research Fellow.*
*Elena Kozhemiakina, Laboratory Technician at the Theoretical Physics Department.*
*Olga Liapeikova, Graduate Student.*
*Olga Voronova, Candidate of Biology, Associate Research Fellow.*
*Dmitry Evseev, Student.*
*Nikita Belozerov, Student.*
*Stepan Vasiliev, Student.*
*Evgenyia Gluschenko, Graduate Student, Associate Research Fellow.*
*Ivan Zhivodernikov, Student.*